茶树 *TIFY* 基因家族鉴定及非生物胁迫下表达分析

姚新转[1]，张宝会[2]，陈湖芳[2]，吕立堂[1,2*]

(1. 贵州大学 茶学院，贵阳 550025；2. 贵州大学生命科学院学院/农业生物工程研究院/山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室，贵阳 550025)

摘　要： *TIFY* 基因家族在茶树激素信号转导及其逆境胁迫具有十分重要的作用。该文利用生物信息学方法对茶树基因组中的 *TIFY* 家族进行了鉴定，并分析其理化性质、系统进化、基因结构、染色体定位、启动子区顺式作用元件、组织表达模式并通过荧光定量对部分 *TIFY* 家族成员进行了非生物胁迫响应。结果表明：（1）茶树 *TIFY* 家族基因成员 19 个（*CsTIFY*1~*CsTIFY*19），分属于 4 个蛋白亚家族 TIFY、JAZ、ZML 和 PPD 且不均匀的分布在 8 条染色体上，按照进化关系及结构特点可分为 7 组，每组内具有相似的基因结构与保守基序组成。（2）*CsTIFYs* 基因的启动子区具有多种包含激素和非生物胁迫响应的顺式作用元件，通过定量 RT-PCR 分析其家族成员对在茉莉酸甲酯、盐（20%氯化钠）、冷（4 ℃）以及干旱（20% 聚乙二醇 6000）处理下反应强烈，部分基因在根与顶芽中有较高的表达量。根据以上结果推测 *TIFY* 基因家族可能在茶树非生物胁迫防御反应等多方面发挥功能作用。

关键词： 茶树，*TIFY* 基因家族，成员鉴定，功能分析，基因表达

中图分类号： Q943　　　　　　　**文献标识码：** A

Genome identification of *Camellia sinensis TIFY* gene family and its expression analysis of abiotic stress

YAO Xinzhuan[1], ZHANG Baohui[2], CHEN Hufang[2], LÜ Litang[1,2*]

(1. *College of Tea Science, Guizhou University*, Guiyang 550025, China; 2. *College of Life Sciences/The Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Regions* (*Ministry of Education*), *Institute of Agro-Bioengineering, Guizhou University*, Guiyang 550025, China)

Abstract: The *TIFY* gene family plays a very important role in *Camellia sinensis* hormone signal transduction and its adversity stress. Bioinformatics methods were employed to identify the *TIFY* family members in the *C. sinensis* genome in the study, and the physical and chemical properties, system evolution, gene structure, chromosomal location, the *cis*-acting elements of promoter region and tissue expression pattern were also analyzed, and the results of quantitative experiments verified the hormone response and stress response characteristics of some members of the *TIFY* family. The results were as follows: (1)There were 19 *TIFY* gene members (*CSTIFY*1-*CSTIFY*19) in *C. sinensis*, which belonged to four protein subfamilies of *TIFY*, *JAZ*, *ZML* and *PPD*, and distributed unevenly on eight chromosomes. According to evolutionary relationship and structural characteristics, *TIFY* gene could be divided into seven groups, and members of each group had similar gene structure and conserved motif. (2)The promoter region of

---

基金项目： 贵州省优秀青年科技人才培养项目[黔科合平台人才[2019]5651]； 贵州大学实验室开放项目（SYSKF2021-005）[Supported by Guizhou Province Outstanding Young Scientific and Technological Talent Training Project [Qianke Heping Platform Talents [2019]5651]; Guizhou University Laboratory Open Project(SYSKF2021-005)]。

作者简介： 姚新转（1989-），硕士，实验师，主要从事植物分子生物学研究，（E-mail）xzyao@gzu.edu.cn。

*通信作者：吕立堂，博士，教授，茶树资源综合利用，（E-mail）ltlv@gzu.edu.cn。

the *CsTIFYs* gene contains a varieties of *cis*-acting elements in response to abiotic stress, the quantitative experiments proved that its family members were highly responsive to Methyl jasmonate, salt (20%), cold (4 ℃) and drought (20% polyethylene glycol 6000) treatments, and some genes were highly expressed during the development of roots and apical buds. Based on the above results, it was speculated that the *TIFY* gene family may play a role in *C. sinensis* hormone signal regulation, stress defense response and growth and development.
Keywords: *Camellia sinensis*, *TIFY* gene family, members identification, functional analysis, gene expression

TIFY 家族是一类包含 *TIFY* 结构域的植物特有转录因子（张沪等，2020），在应激反应中起重要作用（胡利宗等，2020；He et al., 2020），根据保守结构域的不同，*TIFY* 基因家族分为 TIFY、JAZ、ZML 和 PPD 共 4 个亚蛋白家族（Vanholme et al., 2007; Bai et al., 2011）。*TIFY* 亚家族仅含有 *TIFY* 结构域（Staswick et al., 2008），其他 3 类亚家族还包含其他结构域，如：ZM 亚蛋白家族，包括 ZIM（在花序中表达的锌指 Meristem）和 ZML 蛋白，也都包含 C2C2-GATA 锌指 DNA 结合域和 CCT 域（CONSTANS，类似 CO 的 TOC1）；JAZ 亚蛋白家族包含一个保守序列它们的 C 端附近大约有 27 个氨基酸，称为作为 Jas 基序，其顺序与 N 端相似 CCT 域的一部分（Kang et al., 2011）并带有特征基序 SLX2 FX2 KRX2 RX5 PY（Hakata et al., 2012）；PPD 亚蛋白家族具有独特的 N 末端 PPD 结构域（Kang et al., 2011）。

TIFY 家族成员与植物的正常生长以及胁迫响应起着重要作用（赵晓晓等，2020），已有研究表明，在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现 *AtTIFY*1（ZIM）在促进叶柄和下胚轴伸长中的起重要作用(罗冬兰等，2017)，而 *AtTIFY*4a（PPD1）和 *AtTIFY*4b（PPD2）参与了叶片生长（Baekelandt et al., 2018）。拟南芥 TOC1 和 CO 蛋白属于 ZML 类群，主要参与光周期信号转导或者介导蛋白相互作用（Bai et al., 2011），还有其他植物，如：柑橘(*Citrus reticulata*)低温胁迫（张沪等，2020）、水稻（*Oryza sativa*）盐胁迫（Ye et al., 2009）和小麦（*Triticum aestivum*）干旱胁迫(Ebel et al., 2018)等 *TIFY* 基因已经被详细研究，研究表明，*TIFY* 基因都积极参与植物的生长发育以及非生物胁迫。

茶树（*Camellia sinensis*）是很重要的经济作物，对我国的农业和国民经济发展具有重要作用（芦梅，2016）。近年来，茶树栽培面积的扩大，如贵州省茶树种植面积达 50 万公顷（hm^2），由于生物和非生物胁迫引起的茶树灾害十分严重，如：茶芽萌发慢、长势劣、营养积累困难、病虫害多等问题，导致茶叶减产和茶叶品质下降（Cheruiyot et al., 2009; Liu et al., 2016）。目前在茶树中有关 *TIFY* 家族相关报道极少，而茶树基因组测序数据的发布有利于从全基因组水平对茶树 *TIFY* 家族成员进行鉴定与分析（Wei et al., 2018; Wang et al., 2020）。本研究利用茶树基因组数据，鉴定了 2 个 *TIFY*、7 个 *ZML*、2 个 *PPD* 和 8 个 *JAZ* 基因，明确在茶树中的结构特点与进化特征，通过实时荧光定量（RT-qPCR）分析其在茉莉酸甲酯、干旱、冷和盐处理下的表达模式，以期探究该基因家族成员在茶树中的作用机制，同时为进一步研究 *TIFY* 家族基因在茶树胁迫防御机制研究奠定基础，为未来改善植物抗逆性提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料处理

实验材料来源贵州大学教学实践茶园（106°39′18″ E、26°27′13″ N、海拔 1 130 m），选取生长状态良好、长势基本一致的两年生福鼎大白茶树移栽花盆中（丹麦泥炭土），人工气候室条件设置为温度（22±2）℃，湿度 65%的环境下进行干旱（20% PEG-6000 溶液）、盐(20% 氯化钠溶液)和茉莉酸甲酯（1mmol L^{-1}）胁迫。将新鲜制备的 1 mmol L^{-1} 茉莉酸甲溶液喷洒

在不同处理植株的叶片（一芽三叶）上进行激素处理，收集处理（0、12、24、 48h）后的一芽三叶；20%氯化钠溶液和 20% PEG-6000 溶液分别浇灌植物（500 mL 溶液），收集两种处理（0、24、48、72 h） 后的一芽三叶；用光照培养箱进行 4 ℃处理（0、12、24、48 h）的一芽三叶。每个处理 3 个株系，锡箔纸包裹标记，液氮速冻后保存于–80 ℃保存备用。

1.2 茶树 *TIFY* 基因的鉴定与注释

从 TPIA 数据库(http://tpia.teaplant.org/)下载茶树基因组以及蛋白组数据。同时，根据已经鉴定的拟南芥 *TIFY* 序列首先提交给 Pfam 数据库(http://pfam.sanger.ac.uk)获取基因家族的基本结构，发现 TIFY 结构域由 Pfam 登录号 PF06200 表示。使用 HMMER 以 E 值 $1\times e^{-6}$ 搜索茶树基因组数据库（http://tpia.teaplant.org/）中的含有 TIFY 结构域的蛋白作为 TIFY 家族的候选蛋白，使用 HMMER 算法再次确认候选结构域是否完整，将 *TIFY* 基因家族候选蛋白提交至Pfam数据库查询具体保守结构域，删除不包含TIFY结构域的蛋白 (蓝雨纯等，2020)。

1.3 序列比对和系统发育分析

TIFY 家族系统进化分析：将拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）*TIFY*（Vanholme et al., 2007）、杨树（*Populus trichocarpa*）（Wang et al., 2020）、葡萄(*Vitis vinifera*)（Zhang et al., 2012）及筛选到的茶树 TIFY 蛋白序列提交到 Muscle 软件，通过序列多重比对，使用 IQtree 软件计算氨基酸替换模型，使用 IQtree 软件通过 ML(maximum likelihood)法生成进化树，设定自举值为 1 000；茶树 *TIFY* 种内进化分析：将茶树 TIFY 蛋白序列提交到 Muscle 软件，通过序列多重比对，使用 IQtree 软件计算氨基酸替换模型，使用 IQtree 软件采用 ML(maximum likelihood)法构建种内进化树，设定自举值 1 000。

1.4 茶树 *TIFY* 染色体定位和基因结构分析

根据 1.2 的数据获取方法提取基因组注释数据中的 *TIFY* 基因的在茶树染色体上的位置信息提交至 TBtools 软件，得到染色体定位图。茶树 *TIFY* 基因结构分析：将茶树 *TIFY* 家族成员内含子位置、数目信息和基因位置等信息提交至 TBtools 软件，获得基因结构图。茶树 *TIFY* 保守基序分析：将茶树 TIFY 蛋白序列提交至 MEME5.2(http://meme-suite .org/tools/meme)，基序的数目设置为 10，motif 长度设置为 6 到 50 aa，使用 TBtools 可视化相关数据。使用 TBtools 可视化 *TIFY* 基因家族保守结构域信息。

1.5 茶树 *TIFY* 启动子区顺式作用元件分析

根据 1.2 茶树基因组数据提取 *TIFY* 基因上游 2 000 bp 片段作为 *TIFY* 基因的启动子序列，提交至 Plant Cis-Acting Regulatory Elements (http://bioinfor-matics.psb.ugent.be/webtools/plancare/html/）分析启动序列的顺式作用元件，使用 TBtools 可视化相关数据。

1.6 茶树 *TIFY* 基因组织表达模式分析

根据 1.2 的数据获取方法获得茶树不同组织 *TIFY* 基因的表达量（TPM）以及非生物胁迫下 *TIFY* 基因在茶树中的表达量（TPM），使用 TBtools 软件制作基因表达图谱。

1.7 实时定量 RT-PCR 分析

下载茶树 *TIFY* 基因家族序列，并使用 IDT（Integrated DNA Technologies）网站（https://sg.idtdna.com/Scitools/Applications/RealTimePCR/）在线设计引物，选用 *CsGAPDH* 作为内参基因（表 1）。按试剂盒说明书提取茶树叶片 RibonucleicAcid（RNA）（北京华越洋生物科技有限公司），然后按照试剂盒说明书（北京君诺德生物技术有限公司）逆转录成 cDNA，用于实时定量 RT-qPCR。利用 RT-qPCR 仪（T100™ Thermal Cycler，Bio-Rad 公司）进行 RT-PCR 反应，反应程序参考（Yao et al., 2020）。每个样品均设置 3 次技术重复。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 算法计算基因相对表达水平。

表 1 *TIFY* 基因 Real-time PCR 引物序列

Table 1 Primers sequence of *TIFY* genes for real-time PCR

基因名称	上游引物	下游引物

Gene name	Forward primer 5′-3′	Reverse primer 5′-3′
*CsTIFY*1	CAACCCATTGCTACCGATCTAC	GAGGAGAAGTTGAGCTGCTTATT
*CsTIFY*2	GTCTGATCCCTTTGCTTCTTCT	GAGTGCCACCTTGTCCATTAT
*CsTIFY*18	CCAGATCGAAGACGAAGAAGAC	CAAAGCATGCGGATGAACAC
*CsTIFY*6	GAGACCCGAAACCACAAGAA	TGCTGAGGAAAGAGATCCATAAG
*CsTIFY*11	TGCACTCTCTTCAACCGATAAG	TCCATAAGGCGACACGAAAG
*CsTIFY*15	CTTGGGAGGGCGAGAAATAC	ACTTGAGGCACCACCTAAAC
*CsTIFY*8	CGAACAAGGCAGATGTGATAATG	CTCCACTCGGTATGTAGCTTTC
GAPDH	TTGGCATCGTTGAGGGTCT	CAGTGGGAACACGGAAAGC

2 结果与分析

2.1 茶树 *CsTIFY* 基因的全基因组鉴定

共鉴定到 19 个 *TIFY* 序列，命名为 *CsTIFY*1−19，命名顺序参照 *Vv-TIFY* （Zhang et al., 2012），分属 4 个亚家族，如表 2 所示。

表 2 茶树 *TIFY* 基因家族基本信息

Table 2 Basic information of *TIFY* gene family in *Camellia sinensis*

基因名称 Gene name	基因编号 Gene number	染色体 Chromosome	外显子数目 Exons number	蛋白长度 Protein length	分子量 Molecular weight (Da)	等电点 Isoelectric point
*CsTIFY*1	CSS0031905.1	Chr2	5	295	31 531.1	10.08
*CsTIFY*2	CSS0022053.1	Chr12	7	399	41 501.3	8.25
*CsTIFY*3	CSS0012514.3	Chr12	7	399	41 500.3	8.49
*CsTIFY*4	CSS0031620.2	Chr13	9	336	37 334.7	8.84
*CsTIFY*5	CSS0011019.1	Chr3	5	262	29 266.8	9.11
*CsTIFY*6	CSS0010510.1	Chr15	5	234	25 506.6	10.23
*CsTIFY*7	CSS0028188.1	Chr8	3	137	15 604.9	10.45
*CsTIFY*8	CSS0000568.1	Contig605	3	130	13 914.2	4.45
*CsTIFY*9	CSS0050449.1	Chr15	7	304	33 496.6	6.67
*CsTIFY*10	CSS0037100.1	Chr15	7	304	33 483.6	6.67
*CsTIFY*11	CSS0034430.1	Chr6	6	218	24 039.8	9.62
*CsTIFY*12	CSS0017505.2	Chr3	7	324	34 469	4.98
*CsTIFY*13	CSS0003047.1	Chr9	7	282	30 964.1	6.04
*CsTIFY*14	CSS0004261.1	Contig509	7	326	34 657.2	4.98
*CsTIFY*15	CSS0045061.1	Contig509	11	363	39 325.5	4.67
*CsTIFY*16	CSS0050427.1	Contig969	10	364	39 466.1	4.48
*CsTIFY*17	CSS0016802.1	Chr9	11	377	41 223.3	4.56
*CsTIFY*18	CSS0017184.1	Chr13	2	116	12 261.3	3.75
*CsTIFY*19	CSS0036245.1	Chr3	2	115	12 095.4	3.79

2.2 四种植物 *TIFY* 基因的系统发育分析

81 个蛋白序列进行多重比对，利用 IQ-TREE 构建进化树， *TIFY* 基因家族的 4 个亚家族成员构成及分布如下（图 1），PPD 亚蛋白家族包含茶树 CsTIFY4 与拟南芥 AtTIFY4a、AtTIFY4b，但 CsTIFY4 与拟南芥 AtTIFY4a 亲缘关系较远；TIFY 亚蛋白家族包含 CsTIFY15 和 CsTIFY19；ZML 亚家族由 4 个物种构成，共计 20 个成员；剩余其他蛋白序列分属 JAZ

亚蛋白家族，可分为以下 5 个类群(JAZI、JAZII、JAZIII、JAZIV、JAZV)，其中 JAZI 含有最多的 TIFY 序列，占比为 16/37，JAZIV 仅包含 AtTIFY 与 CsTIFY 序列，共计 3 个；JAZV 不包含 CsTIFY（图 1）。

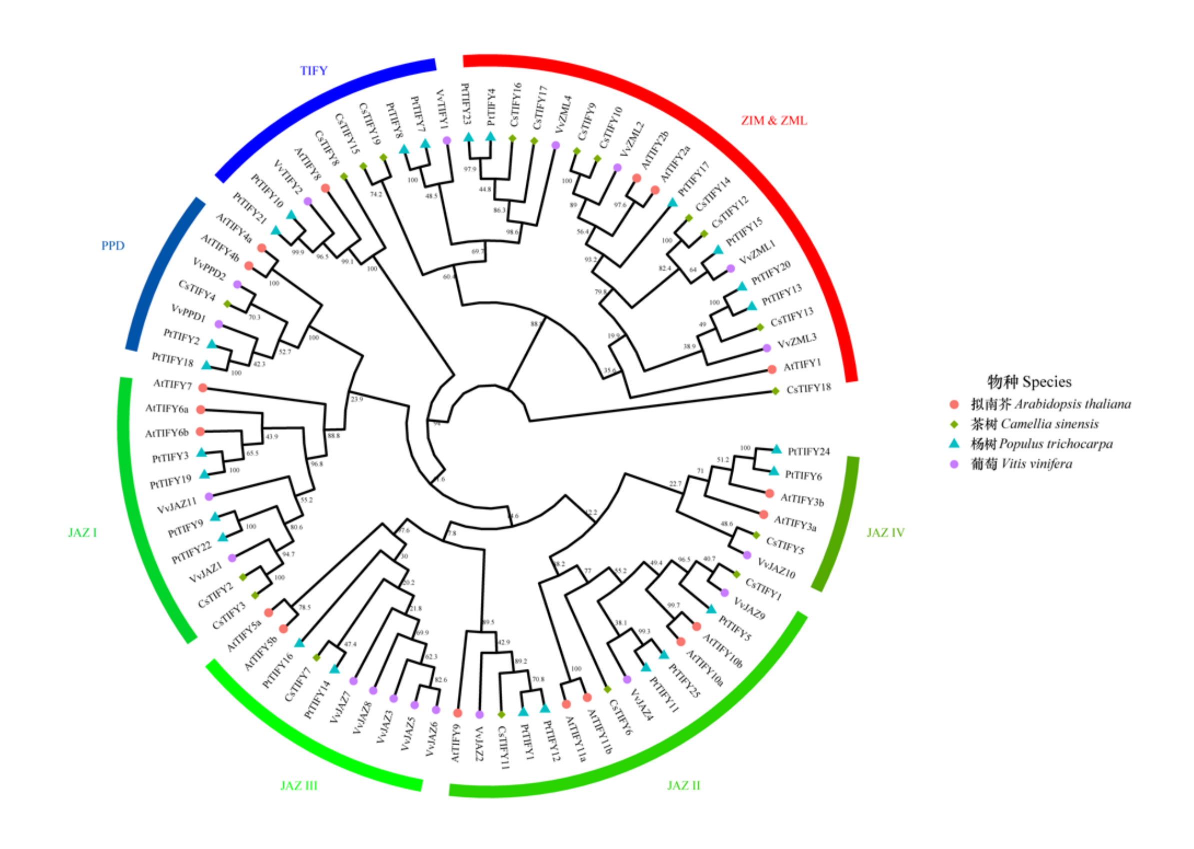
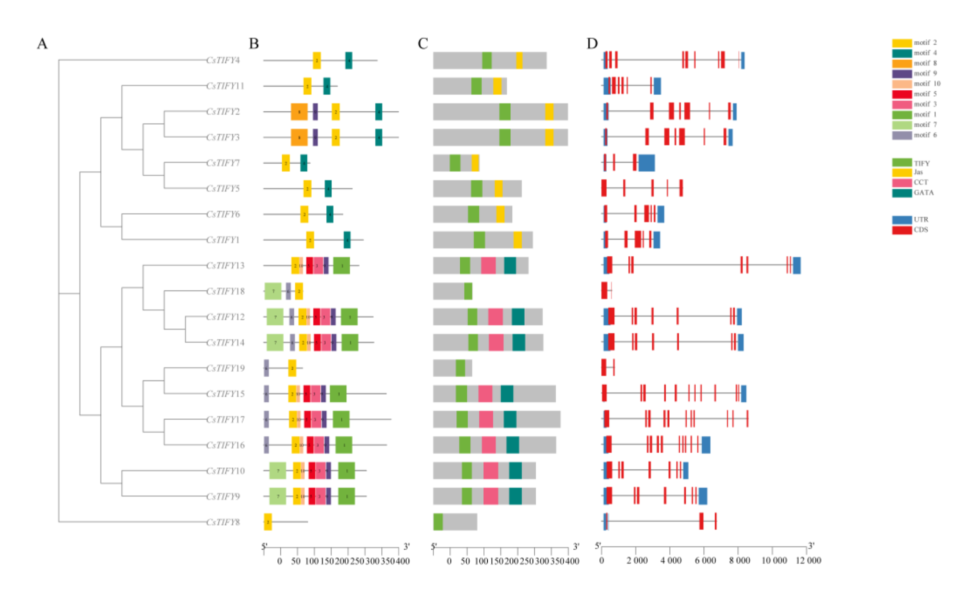


图 1 茶树、葡萄、杨树和拟南芥的 *TIFY* 家族基因系统发育树及其分类（Bootstrap 重复数为 1 000 次）

Fig.1 Phylogenetic analysis of *TIFY* family genes from *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana* (Bootstrap repeats 1 000 times)

2.3 茶树 *TIFY* 基因的功能结构域及结构序列分析

使用氨基酸进行了系统发育分析这里鉴定出 19 个茶树 *TIFY* 基因序列（图 2）。使用来自四种植物的 *TIFY* 序列构建系统发育树（图 1），同一个家族的 TIFY 蛋白倾向于聚类，2 个例外是蛋白 CsTIFY4 和 CsTIFY8 单独一枝（图 2：A）。利用 Multiple Em for Motif Elicitation (MEME)软件对茶树 *TIFY* 保守基序组成和保守基序数目进行分析，共鉴别到 10 个保守基序，依次命名为 motif 1~motif 10，只有 CsTIFY8 包含 motif 2（图 2：B），说明 *TIFY* 家族基因在进化过程中基序比较保守。相反是外显子/内含子结构也可用于提供其他证据来支持系统发育分组（Shiu et al., 2003），因为这种类型的差异通常在基因家族的进化中起关键作用。因此，了解茶树 *TIFY* 基因的外显子/内含子结构（图 2：C），以进一步了解它们可能的基因结构进化。我们的结果表明它们的系统发育与外显子/内含子之间有很强的相关性结构，并且聚在一起的基因通常拥有一个类似的基因结构。实际上，三组基因（*TIFY*2/*TIFY*3、*TIFY*12 和 *TIFY*14）包含完全相同数量的外显子，几乎完全相同外显子长度（图 2：C），表明这些 *TIFY* 基因可能是重复事件的产物。为进一步证实茶树 *TIFY* 基因之间的进化关系，我们还可视化了其保守域的分布（图 2：D）。尽管茶树 *TIFY* 蛋白质序列的氨基酸数量从 115 到 399 不等（表 1），但聚集在一起的蛋白质往往包含相同数量的氨基酸。氨基酸和保守结构域的类似分布，这些结果与外显子/内含子结构分析一致。



A. 茶树 *TIFY* 基因的系统进化；**B**. MEME 预测茶树中 *TIFY* 保守蛋白基序的示意；**C**. 保守功能结构域；**D**. 茶树 *TIFY* 基因基本基因结构。

A. Phylogenetic relationships; **B**. Schematic diagram of the conserved *TIFY* protein motif in *Camellia sinensis* tree predicted by MEME; **C**. Conserved functional domain; **D**. Basic gene structure of *TIFY* genes in *Camellia sinensis*.

图 2 茶树 *TIFY* 基因的功能结构域及结构序列

Fig. 2 Functional domain and sequence of *TIFY* gene in *Camellia sinensis*

2.4 茶树 *CsTIFY* 基因染色体定位

染色体定位分析结果见图3。19个茶树 *CsTIFYs* 基因分别分布在茶树的8条染色体上，分别是染色体 2、3、6、8、9、12、13 和 15。分析出 *CsTIFY* 基因同源基因簇 4 组，分别为位于3号染色体上的 *CsTIFY*12 和 *CsTIFY*19，位于9号染色体上的 *CsTIFY*13 和 *CsTIFY*17，位于 12 号染色体上的 *CsTIFY*2 和 *CsTIFY*3，位于 15 号染色体上的 *CsTIFY*9 和 *CsTIFY*10，其中还有一对同源基因 *CsTIFY*14 和 *CsTIFY*15 未定位到染色体上（图 3）。

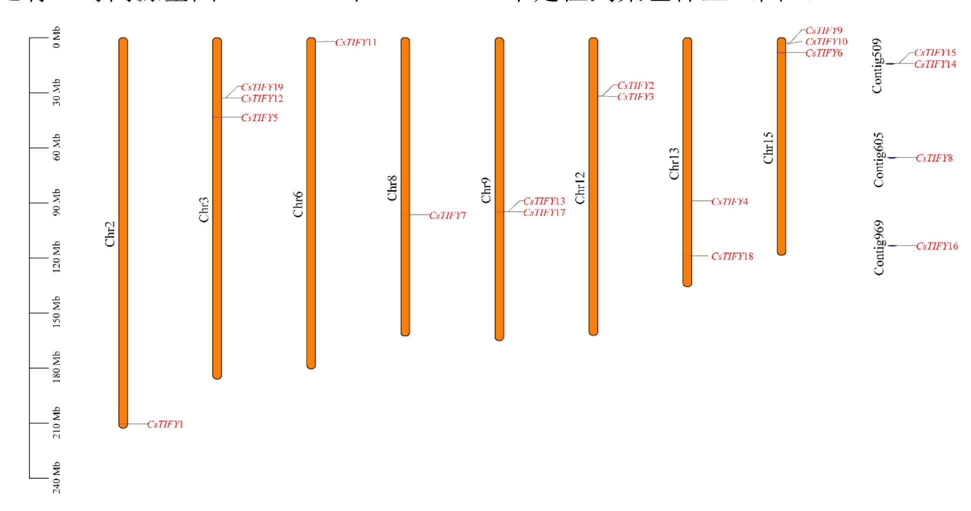
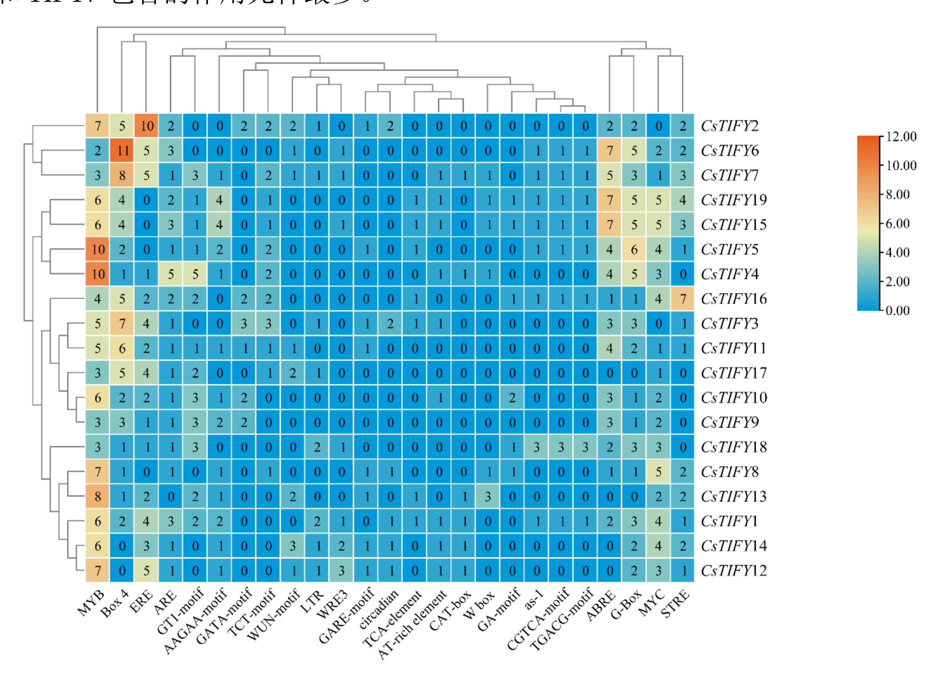


图 3 茶树 *CsTIFY* 基因染色体定位

Fig. 3 Chromosomal locations of *CsTIFY* genes in *Camellia sinensis*

2.5 茶树 *CsTIFY* 基因启动子顺式作用元件

上述 19 个 *TIFY* 基因的启动子区进行顺式作用元件预测（图 4 ），从图中可以看出 MYB 响应元件分布在每个 *TIFY* 基因中，circadian 为光周期响应元件在 *TIFY* 基因中分布最少，*TIFY*1 和 *TIFY*7 包含的作用元件最多。



MYB, **G-Box**, **MYC**, **STRE**. 逆境响应元件；**CAT-box**. 分生组织表达相关的顺式作用调节元件；**Box 4**. 激素、干旱和低温响应；**ERE**, **GT1-motif**, **GARE-motif**. 光和激素响应元件；**ARE**. 乙烯响应元件；**GATA-motif**, **W box**, **AT-rich element**. 干旱、盐和光敏色素响应因子；**TCT-motif**. 激素响应元件；**WUN-motif**. 机械伤害反应元件；**LTR**. 低温响应元件；**WRE3**. 损伤和防御响应元件；**GA-motif**. 光响应元件；**as-1**. 抗病响应元件；**circadian**. 昼夜节律控制的顺式作用调控元件；**TCA-element**. 温度响应因子；**CGTCA-motif**, **TGACG-motif**. MeJA(茉莉酸甲酯)响应元件；**ABRE**, **AAGAA-motif**. ABA（脱落酸）响应元件。

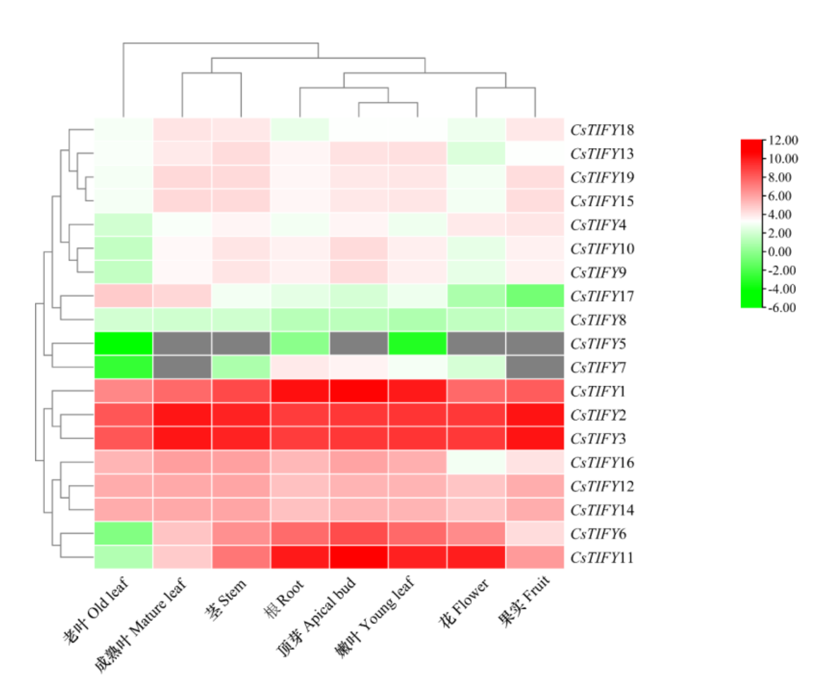
MYB, **G-Box**, **MYC**, **STRE**. Diversity responsive element; **CAT-box**. *cis*-acting regulatory elements related to meristem expression; **Box 4**. Hormones, drought and low temperature response; **ERE**, **GT1-motif**, **GARE-motif**. Light and hormone responsive elements; **ARE**. Ethylene responsive element; **GATA-motif**, **W box**, **AT-rich element**. Drought, NaCl and phytochrome responsive factor; **TCT-motif**. Hormone responsive element; **WUN-motif**. Mechanical damage responsive element; **LTR**. A low temperature responsive element; **WRE3**. Damage and defense response element; **GA-motif**. Light response element; **as-1**. Disease response element; **circadian**. A *cis*-acting regulatory element involved in the control of circadian rhythm; **TCA-element**. Temperature responsive factor; **CGTCA-motif**, **TGACG-motif**. MeJA (methyl jasmonate) responsive elements; **ABRE**, **AAGAA-motif**. ABA (abscisic acid) responsive elements.

图 4 茶树 19 个 *TIFY* 基因的启动子逆境相关顺式作用元件

Fig. 4 Promoter stress-related *cis*-acting elements of the 19 *TIFY* genes in *Camellia sinensis*

2.6 茶树 *CsTIFY* 基因表达模式分析

为了探究茶树 *CsTIFY* 基因家族在茶树不同组织器官的表达模式，将不同基因表达量数据进行热图分析，*CsTIFY*1、*CsTIFY*2、 *CsTIFY*3 在各个组织表达量都高，而 *CsTIFY*5 和 *CsTIFY*7 在各个组织几乎不表达，且 *CsTIFY*11 在根、顶芽、嫩叶和花表达较高基本一致，其中 *CsTIFY*6 在顶芽表达量最高，表明茶树 *CsTIFY* 基因家族成员在不同组织器官表达均存在差异性，暗示其可能基因功能存在分化（图 5）。



颜色刻度表示 log2 转换后的值。红色代表基因高表达；绿色代表基因低表达。

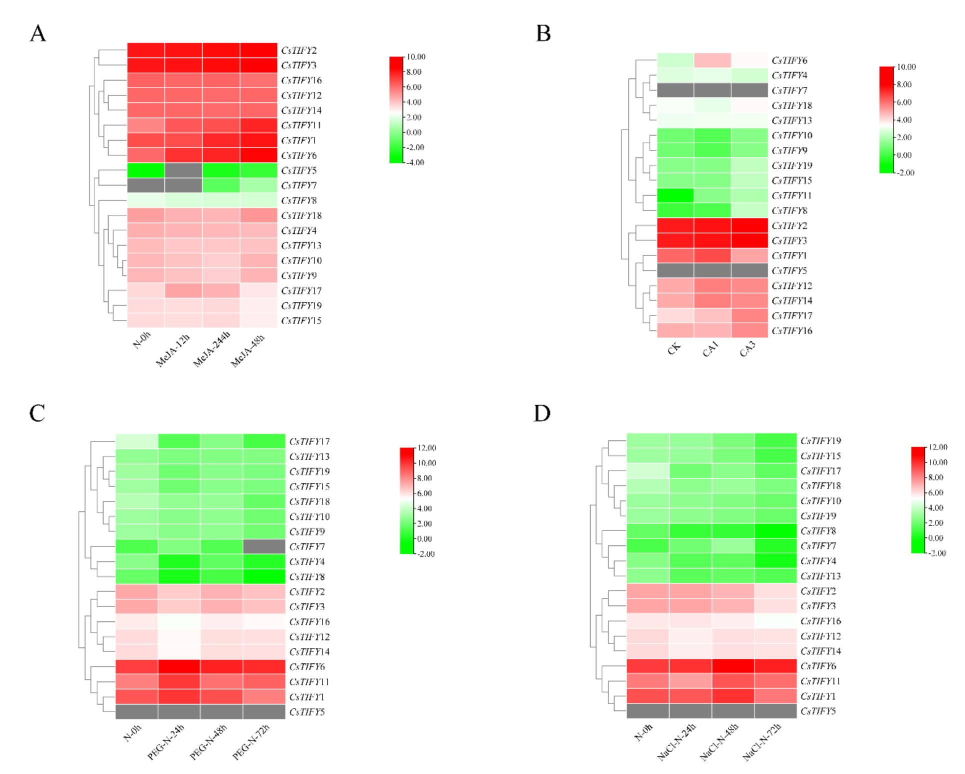
The color scale represents the log2 converted value. Red represents high gene expression; Green represents low gene expression.

图 5 茶树 *CsTIFY* 基因在茶树不同组织中的表达

Fig. 5 Expression of *CsTIFY* gene in different tissues of *Camellia sinensis*

2.7 茶树 *CsTIFY* 基因胁迫下的表达分析

干旱、冷和盐等非生物胁迫对植物生长和生产力造成不利影响，MeJA 处理后的表达数据（Donofrio et al., 2009; Zhao et al., 2020; He et al., 2020）这对于植物的生物逆境响应至关重要(Bari et al., 2009)，在本研究中，我们通过挖掘可公开获得的茶树微阵列数据集，研究了茶树 *TIFY* 家族基因对不同非生物胁迫条件以及激素处理的响应。我们确定了对应于 19 个茶树 *TIFY* 转录本，这些基因表达图谱如图 6 所示，茶树 *TIFY*1 基因对非生物胁迫和激素处理不同时间段表达量都很高，只有干旱胁迫和盐胁迫下 *TIFY*1 随时间的增减表达量降低，而激素处理后 *TIFY*1、 *TIFY*2、 *TIFY*3、 *TIFY*6、 *TIFY*11、 *TIFY*12、 *TIFY*14 和 *TIFY*16 的表达高，而 *TIFY*5 和 *TIFY*7 对非生物胁迫和激素处理在不同的时间段有负调控或不表达；*TIFY*6 在激素、盐和干旱胁迫下表达量最高，而在冷胁迫下表达微弱。结果表明，不同的 *TIFY* 基因在非生物胁迫和激素处理下不同时间段表达量不同。



A. 茉莉酸甲酯处理；**B**. 冷处理；**C**. 干旱处理（PEG6000）； **D**. 盐处理（氯化钠）。下同。

A. Methyl jasmonate treatment; **B**. Cold treatment; **C**. Drought treatment (PEG6000); **D**. Salt treatment (sodium chloride). The same below.

图 6 不同胁迫下茶树 *TIFY* 基因的表达

Fig. 6 *TIFY* gene expression of *Camellia sinensis* under different stresses

2.8 茶树 *CsTIFY* 基因在不同胁迫和外源茉莉酸甲酯处理下的表达分析

根据转录组数据我们分析了不同胁迫下的基因表达情况（图 6），为了确信转录组结果，我们选择了干旱（20% PEG6000）、冷胁迫(4℃)、盐胁迫（20% 氯化钠）和茉莉酸甲酯**(**1 mmol ·L^{-1}**)**，不处理为对照。根据茶树基因组数据不同胁迫基因的表达量选择了 7 个 *TIFY* 基因，进行了实时荧光定量（RT-qPCR）分析，MeJA 处理下，大多数 *TIFY* 有明显的响应，但不尽相同，如 MeJA 显著诱导了 *TIFY*1、*TIFY*6 和 *TIFY*11 的表达，表达量随时间的增加而增加，在 12 h 时表达量最高，随后降低，而 *TIFY*15 在不同时间段表达变化不大；冷胁迫下， *TIFY* 都存在响应，但不尽相同，如冷胁迫显著诱导了 *TIFY*8 和 *TIFY*11 的表达，表达量随时间的增加而增加，而 *TIFY*2 在不同时间段表达变化不大，*TIFY*6 随时间的增加而增加，随后降低；干旱处理下， *TIFY* 基因均表达，但表达水平有一定差异（图 7）。干旱胁迫显著诱导了 *TIFY*6 和 *TIFY*11 的表达，表达量随时间的增加而增加在 12 h 时表达量最高，随后降低，而 *TIFY*8 表达基本没有影响；盐胁迫下，*TIFY*1、*TIFY*2、*TIFY*11、 *TIFY*15 和 *TIFY*18 随胁迫时间增加，随后降低，而 *TIFY*6 不随时间的变化而变化，可知转录组数的基因表达量和 RT-qPCR 基因表达量趋势基本一致。

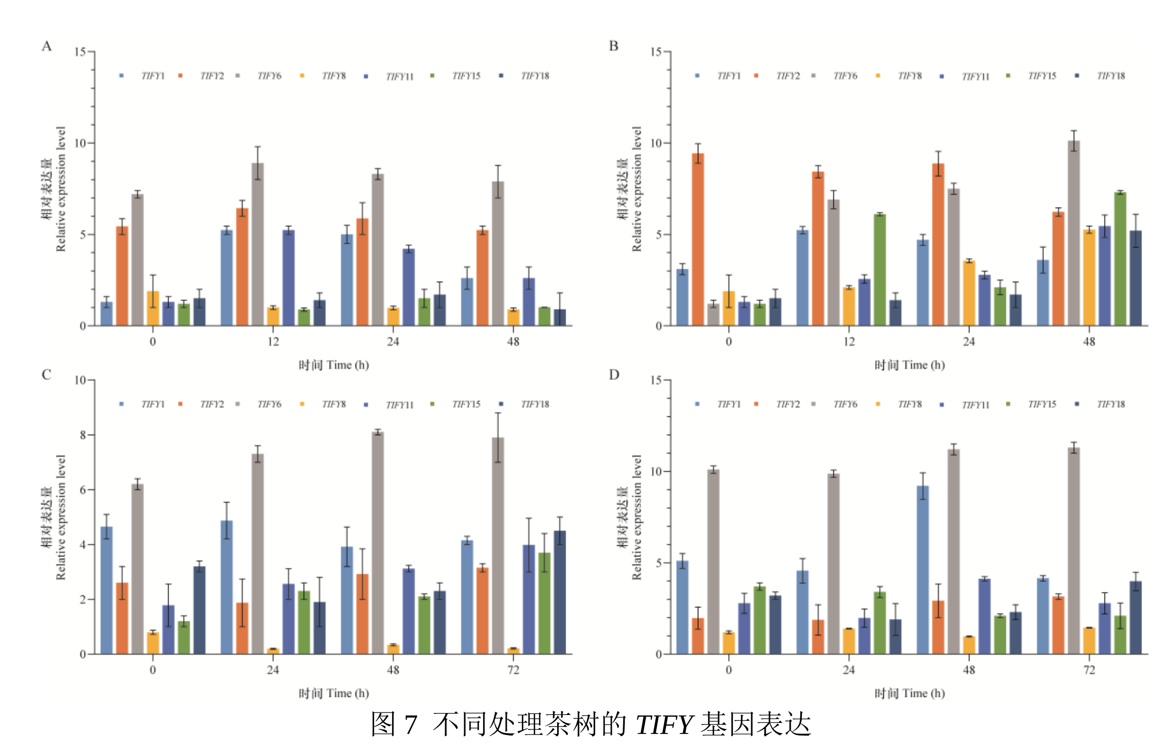


图 7 不同处理茶树的 *TIFY* 基因表达

Fig. 7 *TIFY* gene expression in different treatments of *Camellia sinensis*

3 讨论与结论

TIFY 基因是植物特有的转录因子，可以调控植物分生组织的分裂等重要作用，并显著影响植物的生长发育(赵晓晓等，2019；温东等，2020；Liu et al., 2020；沙伟等，2021)。尤其是 JAZ 蛋白不仅是茉莉酸（jasmonic acid, JA）的信号通路的重要负调控转录因子，还是激素网络的调控枢纽，通过诱导茉莉酸刺激来启动茉莉酸应答基因的转录(吴莹等， 2008)。水稻 *OsJAZ*9 与 *OsSLR* 的互作介导了茉莉酸与赤霉素（gibberellin, GA）的拮抗作用，而协调植株应急响应(Um et al., 2018) ；JAZ1 / JAZ4 与 CBF 诱导因子相互作用抑制转录 ICE1 的功能，从而减弱了 CREPEAT BINDING FACTORS（CBFs）的表达；JAZ1 或 JAZ4 的过表抑制拟南芥对冻胁迫的响应(Hu et al., 2013)；甘蓝型油菜(*Brassica napus*)BnaJAZ7-A3/BnaJAZ7-C3 的过表达提高冷害胁迫(He et al., 2020)等中被研究，但是，茶树 *TIFY* 基因特性和系统进化等仍未见报道。

茶树中 19 个 *TIFY* 基因被鉴定，显示表明，*TIFY* 基因家族包含 4 个亚蛋白家族，且各家族成员中 TIFY-motif 的氨基酸序列包含多种类型，TIFY 蛋白在拟南芥、水稻、杨树和茶树 4 个物种间分为 7 个类群。 除 *CsTIFY*8、*CsTIFY*14、 *CsTIFY*15 和 *CsTIFY*16 外，其他 15 个 *CsTIFY* 分别分布 2、3、6、8、9、12、13 和 15 染色体上，其中 *CsTIFY* 各成员在染色体形成了 4 对同源基因簇，说明该成员间的存在一定的进化关系。

茶树 *TIFY* 基因家族进化关系较近的成员间具有基本相同的内含子/外显子组成，同水稻(Ye et al., 2009)和二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)(Zhang et al., 2015)研究的 *TIFY* 基因家族规律基本一致，不同分组的成员间的组成存在差异(Xu et al., 2012；Hakata et al., 2017)。对于 *TIFY* 的保守基序，*TIFY*8 仅含有 TIFY，此外，其成员缺 *TIFY*8、*TIFY*9、*TIFY*10、*TIFY*12、*TIFY*13、 *TIFY*14、 *TIFY*15、*TIFY*18 和 *TIFY*19 缺少了 JAS-domin，这些具有特殊结构的成员可能在茶树的进化中具有独特性（赵晓晓等，2019）。

茶树 *CsTIFYs* 启动子与激素、胁迫相关的作用元件占主导地位，但不同基因作用元件的种类和个数均不同(Xie et al., 219)，随着激素种类和程度的改变，茶树 *CsTIFYs* 基因响应发

生改变，进而导致其功能差异性。此外，部分基因含有不同的胁迫响应元件（低温响应元件（Box 4、LTR）、干旱响应元件（Box 4、GATA-motif、 W box 和 AT-rich element）、盐响应元件（GATA-motif、W box 和 AT-rich element）、激素响应元件（ARE、Box 4、CGTCA- motif、TGACG-motif、ABRE、AAGAA-motif）及逆境响应元件（MYB、G-Box、MYC 和 STRE）等），推测 *CsTIFY* 可能参与不同激素信号传到调节，从而对环境胁迫做出应答。为了更好地了解茶树 *CsTIFYs* 基因的表达差异，本研究对 *CsTIFYs* 在不同组织的基因表达进行分析，结果发现茶树 *TIFY*1 基因对不同胁迫不同时间段表达量都很高，只有 PEG6000 和盐胁迫下 *TIFY*1 随时间的增减表达量降低，*TIFY*1、*TIFY*2、*TIFY*3、*TIFY*6、*TIFY*11、*TIFY*12、*TIFY*14 和 *TIFY*16 激素处理高表达，而 *TIFY*5 和 *TIFY*7 对胁迫在不同的时间段有的负调控或不调控；*TIFY*6 在激素、盐和干旱胁迫下表达量最高，而在冷胁迫下表达微弱。 茶树 *CsTIFYs* 基因在不同组织均存在表达差异性，推测 *CsTIFYs* 在基因调控上也存在一定的差异。同时，该论文筛选了在不处理下表达量高的 *TIFY* 家族成员进行 RT-qPCR（Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction）验证在胁迫处理下的 *TIFY* 基因的表达情况，结果表明，7 个 *TIFY* 家族成员对激素以及非胁迫有较强的反应，在激素处理 12 h，*TIFY*6 基因的表达是 *TIFY*15 的 8.5 倍，是 *TIFY*8 的 8.7 倍；在冷处理 48 h，*TIFY*6 表达量达到最高，是 *TIFY*1 的 3.2 倍；干旱处理 48 h，*TIFY*6 的表达量最高为 7.42，是 *TIFY*8 的 11 倍；盐处理 48 h 时基因表达量最高，*TIFY*6 为 11.4，*TIFY* 为 8.64，可知 *TIFY*6 基因在不同的处理不同时间段基因的表达差异性显著，因此，*TIFY*6 基因可作为茶树在受到外界胁迫时得候选基因。

总之，茶树 *TIFY* 家族成员，通过生物信息学进行分析，进一步确定了茶树 *TIFY* 基因家族的分类和进化关系。同时，分析 *TIFY* 基因家族的启动子顺式作用元件、表达模式以及外源激素处理和非生物胁迫处理下的表达特性，初步探究了 *TIFY* 基因家族参与胁迫应答和激素调控等茶树的生长发育，同时，该研究把 *TIFY*6 基因列为调控不同环境条件下逆境变化的候选基因，为进一步研究茶树 *TIFY* 基因家族生物的功能提供了一定的研究方向和基础。

参考文献：

ALEXANDRA B, LAURENS P, WANG Z, et al., 2018. *Arabidopsis* leaf flatness is regulated by PPD2 and NINJA through repression of *CYCLIN D*3 genes [J]. Plant Physiol, 178: 327.

BAI Y, MENG Y, HUANG D, et al., 2011. Origin and evolutionary analysis of the plant-specific *TIFY* transcription factor family [J]. Genomics 98(2): 128–136.

BARI R, JONES JDG, 2009. Role of plant hormones in plant defence responses [J]. Plant Mol Biol, 69: 473–488.

CHERUIYOT EK, MUMERA LM, NG'ETICH WK, et al., 2009. Fertilizer rates increase susceptibility of tea to water stress [J]. J Plant Nutr, 33(1): 115-129.

DONOFRIO C, COX A, DAVIES C, et al., 2009. Induction of secondary metabolism in grape cell cultures by jasmonates [J]. Funct Plant Biol, 36(4): 323–338.

EBEL C, BENFEKI A, HANIN M, et al., 2018. Characterization of wheat (*Triticum aestivum*) *TIFY* family and role of *Triticum* durum *TdTIFY*11*a* in salt stress tolerance [J]. PLoS ONE, 13(7): 566

GUO YC, WANG PJ, CHEN D, et al., 2019. Genome-wide identification and expression analysis of *SRO* gene family in *Camellia sinensis* [J]. J Tea Sci , 39(4): 392-402. [郭永春，王鹏杰，陈笛，等， 2019. 茶树 *SRO* 基因家族的鉴定及表达分析 [J]. 茶叶科学，39（4）：392-402.]

HAKATA M, MURAMATSU M, NAKAMURA H, et al., 2017. Overexpression of *TIFY* genes promotes plant growth in rice through jasmonate signaling [J]. J Agric Chem Soc Jpn, 81(5): 906-913.

HE X, KANG Y, LI WQ, et al., 2020. Genome-wide identification and functional analysis of the *TIFY* gene family in the response to multiple stresses in *Brassica napus* L. [J]. BMC Genomics , 21(1): 736.

HU LZ, LI CQ, ZHANG WL, et al.， 2020. Genome-wide identification and phylogenetic analysis of the *TIFY* genes in common bean (*Phaseolus vulgaris*) [J]. Mol Plant Breed, 18(10): 3132-3140. [胡利宗，李超琼，张雯露，等，2020. 菜豆 *TIFY* 基因的全基因组鉴定与系统进化分析 [J]. 分子植物育种，18（10）：3132-3140.]

HU YR, JIANG LQ, WANG F, et al., 2013. Jasmonate regulates the inducer of cbf expression-c-repeat binding factor/dre binding factor1 cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 25(8): 2907–29024.

KANG CHANG K, HANJ, LEE J, et al., 2011. Gene encoding PnFL-2 with TIFY and CCT motifs may control floral induction in *Pharbitis nil* [J]. Genes & genomics, 33(3): 229-236.

LAN YC, HUANG B, WEI J, et al., 2020. Identification and bioinformatics analysis of the expansin gene family of *Physcomitrella patens* [J]. Guihaia, 40 (6)：854-863. [蓝雨纯，黄彬，韦娇，等，2020. 小立碗藓扩展蛋白基因家族的鉴定与生物信息学分析 [J]. 广西植物，40（6）：854-863.]

LIU SC, JIN JQ, MA JQ, et al., 2016. Transcriptomic analysis of tea plant responding to drought stress and recovery [J]. PLoS ONE, 11(1): e0147306.

LIU X, ZHAO CB, YANG LM, et al.， 2020. Genome-wide identification, expression profile of the *TIFY* Gene family in *Brassica oleracea var*. capitata, and their divergent response to various pathogen intections and phytohormone treatments [J]. Genes, 11(2): 127.

LU M, 2016. The management model and economic analysis of the development of China's tea industry [J]. Fujian J tea, 38(9): 99-100. [芦梅，2016. 中国茶叶产业发展的管理模式与经济学分析［J］. 福建茶叶，38（9）：99-100.]

LUO DL, BA LJ, CHEN JY, et al., 2017. Characterization and expression analysis of banana *MaTIFY1* transcription factor during fruit ripeningj [J]. Acta Horticul Sin, 44(1)43-52. [罗冬兰，巴良杰，陈建业，等，2017. 香蕉 *MaTIFY1* 转录因子特性及其在成熟过程中基因表达分析 [J]. 园艺学报，44(1)：43-52.]

SHIKATA M, MATSUDA Y, ANDO K, et al., 2004. Characterization of *Arabidopsis* ZIM, a member of a novel plant-specific *GATA* factor gene family [J]. J Exp Bot, 55(397): 631–639.

SHIU SH, BLEECKER AB, 2003. Expression of the receptor-like kinase/pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 132(2): 530–543.

STASWICK PE, 2008. JAZing up jasmonate signaling [J]. Trends Plant Sci, 13 (2): 66–71.

SHA W, WEI J, ZHANG MJ, et al., 2021. Cloning and expression analysis of the drought stress related transcription factor gene *RcTIFY*1 of *Racomitrium Canescens* [J]. Mol Plant Breed: 1-11.[2021-05-12] https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210512.1115.014.html. [沙伟，卫杰，张梅娟，等，2021. 砂藓干旱胁迫相关基因转录因子 *RcTIFY1* 基因的克隆及表达分析 [J]. 分子植物育种 :1-11. [2021-05-12] https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210512.1115.014.html]

UM TY, LEE HY, LEE S, et al., 2018. Jasmonate ZIM-domain protein9 interacts with slender rice to mediate the antagonistic interaction between jasmonic and gibberellic acid signals in rice [J]. Frontiers in plant sci, 9.

WANG HZ, LENG X, XU XM, et al., 2020. Comprehensive analysis of the *tify* gene family and its expression profiles under phytohormone treatment and abiotic stresses in roots of *Populus trichocarpa* [J]. Forests, 11(3): 315.

WANG XC, FENG H, CHANG YX, et al., 2020. Population sequencing enhances understanding of tea plant evolution [J]. Nat Commun, 11(1): 4447.

WEI CL, YANG H, WANG SB, et al., 2018. Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. *sinensis* provides insights into the evolution of the tea genome and tea quality [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 115(18): E4151-E4158.

WEN D, WANG MY, MI YL, et al., 2020. Genome-wide identification and characterization of *TIFY* gene family in medicinal plant *Cannabis sativa* [J]. Chinese J Exp Form, 26(24): 134-143. [温东，王梦月，米要磊，等，2020. 中药火麻仁基原植物大麻的 *TIFY* 基因家族鉴定及功能分析[J]. 中国实验方剂学杂志，26（24）: 134-143.]

WU Y, TAO L, YUAN HM, et al., 2008. Jasmonic acid signaling mediated by JAZ protein [J]. Anhui Agric Sci, 36(16): 6811-6812. [吴莹，陶雷，袁红梅，等，2008. JAZ 蛋白介导的茉莉酸信号传递［J］. 安徽农业科学，36（16）：6811-6812.]

XIE SF, CUI LC, LEI XL, et al., 2019. The *TIFY* gene family in Wheat and its progenitors: genome-wide identification, evolution and expression analysis [J]. Current Genom, 20(5): 371-388.

XU G, GUO C, SHAN H, et al., 2012. Divergence of duplicate genes in exon-intron structure [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 109(4): 1187-1192.

YAO XZ, CHEN MJ, ZHAO DG, et al., 2020. Overexpression of the *Sorghum bicolor* K^+ /Na^+ transporter gene, *SbSKC1*, enhances salt tolerance in poplar (*Populus tomentosa*) [J]. Intl J Agric Biol, 24: 304–310.

YE HY, DU H, TANG N, et al., 2009. Identification and expression profiling analysis of *tify* family genes involved in stress and phytohormone responses in Rice [J]. Plant Mol Biol, 71(3): 291-305.

ZHANG H, XIAO C, WANG GY, et al., 2020. Analysis of citrus *TIFY* gene structure characteristics and response to low temperature expression [J]. S Chin Fruit Tree, 49(2): 34-39. [张沪，肖翠，王贵元，等，2020. 柑桔 *TIFY* 基因结构特征及响应低温表达分析[J]. 中国南方果树，49（2）：34-39.]

ZHANG L, YOU J, CHAN Z, 2015. Identification and characterization of *TIFY* family genes in *Brachypodium distachyon* [J]. J Plant Res, 128(6): 995-1005.

ZHANG YC, GAO M, SINGER SD, et al., 2012. Genome-Wide identification and analysis of the *TIFY* gene family in grape [J]. PLoS ONE, 7(9): e44465.

ZHAO CY, PAN XW, YU Y, et al., 2020. Overexpression of a *TIFY* family gene, *GsJAZ2*, exhibits enhanced tolerance to alkaline stress in soybean [J]. Mol Breed: New Strategies in Plant Improvement, 40(3): 33.

ZHAO XX, XIE KL, ZHANG SM, et al., 2019. Identification and analysis of *TIFY* gene family in switchgrass [J]. Acta Agr Sin, 27(5): 1126-1137. [赵晓晓，谢坤良，张舒梦，等， 2019.柳枝稷 *TIFY* 基因家族的鉴定与分析 [J]. 草地学报，27（5）：1126-1137.]